

10/533310
PCT/JP03/14013 #2
Rec'd PCT/PTO 29 APR 2005
31.10.03

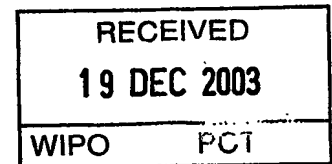
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 0 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 1 8 3 0 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 1 8 3 0 3]



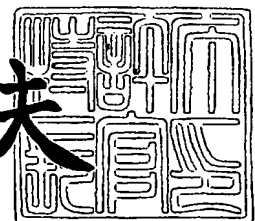
出 願 人
Applicant(s): 明治製菓株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 2 月 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 PF668

【提出日】 平成14年10月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/56

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内

【氏名】 岡倉 薫

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内

【氏名】 矢内 耕二

【特許出願人】

【識別番号】 000006091

【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

【代表者】 北里 一郎

【電話番号】 03-3273-3357

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書**【発明の名称】 界面活性剤に耐性な新規セルラーゼ****【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる親セルラーゼの162番目及び／又は166番目のアミノ酸残基が、親セルラーゼのアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有してなるセルラーゼ。

【請求項2】 配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のセルラーゼ。

【請求項3】 166番目のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されていることを特徴とする請求項1に記載のセルラーゼ。

【請求項4】 配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する、請求項3に記載のセルラーゼ。

【請求項5】 配列番号5に示されるアミノ酸配列を有するセルラーゼ。

【請求項6】 請求項1～5に記載のセルラーゼをコードするDNA。

【請求項7】 請求項6に記載のDNAを含んでなる、発現ベクター。

【請求項8】 請求項7に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項9】 請求項8に記載の宿主細胞を培養し、その宿主および／またはその培養物からセルラーゼを採取する工程を含んでなる、請求項1～5のいずれか一項に記載のセルラーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】**【0 0 0 1】****【発明の属する分野】**

本発明は、配列番号1に示される親セルラーゼの一部のアミノ酸配列が置換されたアミノ酸配列を有する新規なセルラーゼに関する。

【0 0 0 2】**【従来の技術】**

セルラーゼは、その特性を活かしてさまざまな産業分野で利用されている。具体的な利用分野の一つは繊維加工分野であり、特にセルロース含有繊維に所望の特性を与えるための処理がなされている。すなわち、セルロース含有繊維の肌ざ

わり及び／又は外観を改善するために、そして、着色されたセルロース含有繊維に色の局所的な変化を提供する「ストーンウォッシュ」様外観を与える「バイオウォッシュ」のためにセルラーゼが使用されている。また、近年では木材パルプ由来のセルロースを有機溶媒に溶解して紡糸する再生セルロース系繊維であるリヨセルが、その強度や吸水性等の性質、更には環境汚染を起こしにくい製造法から注目を集めているが、その製造工程で発生する繊維表面の毛羽を除く加工にセルラーゼが用いられている。

【0003】

従来、セルラーゼは複数の酵素の共同作用によりセルロースを分解する作用があるとされてきた。近年、蛋白分離技術や遺伝子技術の進展により、複合酵素であるセルラーゼから、上記の繊維加工に適した酵素成分を分離し製造する試みがなされている。とりわけ、糸状菌のトリコデルマ (*Trichoderma*) 属、フミコーラ (*Humicola*) 属由来のセルラーゼについては研究が進み、フミコーラ属では、CBH I、EG V、NCE4、NCE2などが、トリコデルマ属では、CBH I、CBH II、EG II、EG IIIなどの成分が単離され、遺伝子操作によって過剰発現酵素やモノコンポーネント酵素などを調製することにより、各用途に適した特定セルラーゼ成分を多量に含むセルラーゼ調製物が製造されるようになってきた。

【0004】

また、エンドグルカナーゼ酵素NCE5は、デニム染めセルロース含有繊維へのストーンウォッシュ外観の付与、肌触りの改善において、その処理工程中で衣料にインジゴ染料の一部が再付着または逆染色、すなわち白場汚染 (back staining) の度合いが低いセルラーゼとして有用であることが知られている (特許文献1参照)。

【0005】

一方、セルラーゼを衣料用洗浄剤用途に用いる場合には、必要なセルラーゼ成分を量的に改善するだけでなく質的に改善することが望まれている。即ち、衣料用洗浄剤には各種界面活性剤が配合されているとともに、これを水に溶解した場合アルカリ性 (pH 10~11) を示すことから、衣料用洗浄剤に配合されるセルラーゼの性質として各種界面活性剤に対して耐性であること及びアルカリ性条件下

でより強い活性を示すことが求められている。

【0006】

【特許文献1】

WO 01/90375 (第2-3頁及び配列表 配列番号1)

【0007】

【本発明が解決しようとする課題】

本発明は、界面活性剤に耐性及び／又はアルカリ性条件下で高い活性を有する新規なセルラーゼを提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるセルラーゼ (NCE5) において、そのアミノ酸配列における162番目及び／又は166番目のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することによって、界面活性剤に耐性及び／又はアルカリ性条件下で高い活性を有する新規なセルラーゼを取得することに成功した。すなわち本発明は、以下の通りである。

【0009】

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる親セルラーゼの162番目及び／又は166番目のアミノ酸残基が親セルラーゼのアミノ酸とは異なるアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有してなるセルラーゼ。

(2) 162番目のアミノ酸がプロリンに置換されていることを特徴とする上記 (1) に記載のセルラーゼ。

(3) 166番目のアミノ酸がグルタミン酸又はアスパラギン酸に置換されていることを特徴とする上記 (1) に記載のセルラーゼ。

(4) 上記 (1) ～上記 (3) に記載のセルラーゼをコードするDNA。

(5) 上記 (4) に記載のDNAを含んでなる、発現ベクター。

(6) 上記 (5) に記載の発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

(7) 上記 (6) に記載の宿主細胞を培養し、その宿主および／またはその培養物から上記 (1) ～上記 (3) のいずれか一項に記載のセルラーゼを採取する工程を

含んでなる、上記 (1) ～上記 (3) のいずれか一項に記載のセルラーゼの製造法。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

親セルラーゼ

本発明において、親セルラーゼとは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列よりなるセルラーゼである。また、本親セルラーゼを生産する宿主の種類によっては分泌シグナル配列のプロセッシングが異なることがあることから、その結果として N 末端に 1 ～複数個のアミノ酸が付加又は欠失されたような相同体も親セルラーゼに含まれる。

【0012】

本発明における新規なセルラーゼ

本発明における新規なセルラーゼは、親セルラーゼが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列よりなるものである場合、そのアミノ酸配列中の 162 および 166 番目のアミノ酸から選択される 1 個または 2 個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基によって置換されたセルラーゼがその具体例として挙げられるが、天然に分離された菌株等から結果として得られたセルラーゼも、本発明のセルラーゼに含まれる。

【0013】

本発明の好ましい態様によれば、配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列の 162 番目のアミノ酸がプロリンに、166 番目のアミノ酸がグルタミン酸またはアスパラギン酸に置換されたものが好ましいものとして挙げられる。本発明の更に好ましい態様によれば、配列番号 3 ～配列番号 5 に示されたアミノ酸配列を有するセルラーゼが更に好ましいものとして挙げられる。これらのセルラーゼは、界面活性剤に耐性及び／又はアルカリ性条件下で高い活性が保持されるという有利な性質を有している。

【0014】

また、親セルラーゼが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の相同体である場合

には、配列番号1に示されるアミノ酸配列の162および166番目のアミノ酸に相当する位置のアミノ酸から選択される1個または2個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基により置換されてなるものがその具体例として挙げられる。ここで、配列番号1に示されるアミノ酸配列よりなる親セルラーゼの相同体において置換されるべきアミノ酸残基の位置は、公知のアルゴリズムによるアミノ酸配列の比較によって容易に選択することができる。

【0015】

本発明における新規なセルラーゼの作製

本発明の新規なセルラーゼは、組換えDNA技術、ポリペプチド合成技術などによって作製することができるほか、天然から分離された菌株から取得することもできる。

【0016】

組換えDNA技術を用いる場合には、親セルラーゼをコードするDNAを取得し、このDNA内で特異的部位に突然変異を発生させてコードするアミノ酸を置換させた後、変異処理を施したDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、形質転換細胞を培養することによって新規なセルラーゼを調製することができる。親セルラーゼをコードするDNAとしては、使用する宿主細胞を勘案し、配列番号1に示されるアミノ酸配列から適宜全合成可能であるが、好ましくは配列番号2に示される塩基配列からなるものであり、これはフミコーラ・インソレンスのcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法で取得可能である。

【0017】

遺伝子の特定部位に突然変異を導入するための幾つかの方法は、Gapped duplex法 (Methods in Enzymology, 154, 350 (1987))、Kunkel法 (Methods in Enzymology, 154, 367 (1987)) など当業者に公知である。これらの方法は、親セルラーゼをコードするDNA内で特異的部位に突然変異を発生させることに利用することができる。変異処理後のDNAの塩基配列は、マキシムーギルバードの化学修飾法 (Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Gene, 19, 269 (1982)) 等により確認することができ、本発明におけるセルラーゼのアミノ酸配列は、確認された塩基配列より解読することができ

る。

【0018】

本発明における新規なセルラーゼの生産

本発明におけるセルラーゼは、それをコードするDNA断片を、宿主細胞内で複製可能且つ同遺伝子が発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクター、の形態として宿主細胞の形質転換を行い、その宿主細胞において産生させることができる。

【0019】

よって、本発明においては、前記の本発明によるセルラーゼをコードするDNA断片を、宿主微生物内で複製可能で、且つ、そのDNA断片がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。本発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、染色体外の独立体として存在し、その複製が染色体の複製に依存しない、例えば、プラスミドを基本に構築することができる。また、本発現ベクターは、宿主微生物に導入されたとき、その宿主微生物のゲノム中に組み込まれ、それが組み込まれた染色体と一緒に複製されるものであってもよい。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

【0020】

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望の活性を有するタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるDNA断片の他に、その発現を制御するDNA配列や形質転換体を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが望ましい。発現を制御するDNA配列としては、プロモーター、ターミネーター及びシグナルペプチドをコードするDNA配列等がこれに含まれる。プロモーターは宿主微生物において転写活性を示すものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するDNA配列として得ることができる。また、シグナルペプチドは、宿主微生物において、タンパク質の分泌に寄与するものであれば特に限定されず、宿主微生物と同種又は異種のいずれかのタンパク質をコードする遺伝子から誘導されるDNA配列より得ることができる。また、本発明における遺伝子マーカーは、

形質転換体の選択の方法に応じて適宜選択されてよいが、例えば薬剤耐性をコードする遺伝子、栄養要求性を相補する遺伝子を利用することができる。

【0021】

更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、糸状菌などを用いた系、及び、それらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。また、この発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

【0022】

更に、この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記の本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。したがって、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造方法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同等であってよい。また、形質転換体を培養した後、目的のタンパク質を回収する方法は、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0023】

微生物の寄託

本発明の親セルラーゼをコードするDNAを含むプラスミドpNCE5Bamで形質転換された大腸菌JM109株は、平成12年4月18日FERM BP-7138の受託番号のもと工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0024】

【実施例】

以下に本発明の実施例を示すが、これは単なる一例であって本発明を限定するものではなく、ここに例示しなかった多くの変法あるいは修飾手段のすべてを包括するものである。

【0025】

実施例1：セルラーゼをコードする遺伝子の作成

配列番号1に記載のアミノ酸配列から成る親セルラーゼの162番目のアミノ酸がプロリンに置換されたセルラーゼ（以下A162Pとする。配列番号3）、166番目の

アミノ酸がグルタミン酸に置換されたセルラーゼ（以下K166Eとする。配列番号4）、162番目及び166番目のアミノ酸がそれぞれプロリン及びグルタミン酸に置換されたセルラーゼ（以下APKEとする。配列番号5）をコードするDNAは以下に示すようにして作成した。

【0026】

WO 01/90375に記載のプラスミドpNCE5Bamを鋳型DNAとし、LA PCR in vitro Mutagenesis Kit（宝酒造株式会社製）を使用して親セルラーゼをコードするDNAに部位特異的変異を導入した。方法はキットに添付のプロトコールに従った。変異導入用のプライマーとして以下に示す3種のプライマーを使用した。

NCE5-A162P：5'-GGGGAAGGGGTCGCACTCGTGGCGTTG-3'（配列番号6）

NCE5-K166E：5'-CTTGAGCTCCTCGGGGAAGGCGTCGCA-3'（配列番号7）

NCE5-APKE：5'-GAGCTCCTCGGGGAAGGGGTCGCACTCGTG-3'（配列番号8）

プライマーNCE5-A162PはセルラーゼA162PをコードするDNAを作成するためのプライマーであり、プライマーNCE5-K166EはセルラーゼK166EをコードするDNAを作成するためのプライマーであり、プライマーNCE5-APKEはセルラーゼAPKEをコードするDNAを作成するためのプライマーである。

【0027】

上記3種のプライマーを使用して得られた変異導入PCR産物を制限酵素EcoR I及びPst Iで消化後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出しエタノール沈殿を行った。これらを予め制限酵素EcoR I及びPst Iで消化しておいたプラスミドpUC118と連結し、プラスミドpNCE5AP-118（A162P）、pNCE5KE-118（K166E）及びpNCE5APKE-118（APKE）を得た。これら3種のプラスミドの挿入断片について全塩基配列を蛍光DNAシーケンサーABI PRISM 310 Genetic Analyzer（パーキン・エルマー社製）を用いて決定した結果、各DNA断片には目的の変異のみが導入されていることが確認された。

【0028】

実施例2：各セルラーゼ遺伝子のフミコーラ・インソレンスでの発現

(1) セルラーゼ遺伝子発現用プラスミドの構築

実施例1で得られた各セルラーゼ遺伝子を含むプラスミドpNCE5AP-118、pNCE5

KE-118及びpNCE5APKE-118を制限酵素BamH Iで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約0.7kbpのDNA断片を回収した。これらを、予め制限酵素BamH Iで消化し、大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）を用いてDNA末端を脱リン酸化しておいたフミコーラ・インソレンス FERM BP-5977用発現ベクター-pJD-c5（WO 01/90375に記載）と連結し、各セルラーゼ遺伝子を発現させるためのプラスミドpNCE5AP（A162P）、pNCE5KE（K166E）、pNCE5APKE（APKE）を得た。

【0029】

(2) フミコーラ・インソレンス FERM BP-5977の形質転換

フミコーラ・インソレンス FERM BP-5977を（S）培地中37℃で培養し、24時間後、3000 rpm、10分間遠心分離により集菌した。（S）培地の組成は、実施例1に記載した（N）培地にグルコース（3.0%）を加え、アビセルを除いたものである。得られた菌体を0.5 M シュークロースで洗浄し、0.45 μ mのフィルターで濾過したプロトプラスト化酵素溶液（3 mg/mL -glucuronidase、1 mg/mL Chitinase、1mg/mL Zymolyase、0.5 M シュークロース）10 mLに懸濁した。30℃で60～90分間振盪し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過した後、2500 rpm、10分間遠心分離してプロトプラストを回収し、SUTC緩衝液（0.5 M シュークロース、10 mM 塩化カルシウム、10 mMトリス塩酸（pH 7.5））で洗浄した。

【0030】

以上のように調製したプロトプラストを1 mLのSUTC緩衝液に懸濁し、この100 μ Lに対し10 μ gのDNA（TE）溶液（10 μ L）を加え氷中に5分間静置した。次に、400 μ LのPEG溶液（60% PEG4000、10mM 塩化カルシウム、10 mMトリス塩酸（pH 7.5））を加え、氷中に20分間静置した後、10 mLのSUTC緩衝液を加え、2500 rpm、10分間遠心分離した。集めたプロトプラストを1 mLのSUTC緩衝液に懸濁した後、4000 rpmで5分間遠心分離して、最終的に100 μ LのSUTC緩衝液に懸濁した。

【0031】

以上の処理を加えたプロトプラストを、ハイグロマイシン（200 μ g/mL）添

加YMG培地 (1% グルコース、0.4% 酵母エキス、0.2% モルトエキス、1%寒天 (pH 6.8)) 上に、YMG軟寒天とともに重層し、37℃、5日間培養後、形成したコロニーを形質転換体とした。

【0032】

(3) SDS-PAGEによる形質転換体の評価

前述のようにしてプラスミドpNCE5AP、pNCE5KE及びpNCE5APKEを用いて得られたフミコーラ・インソレンス 形質転換体を (N) 培地 (5.0%アビセル、2.0%酵母エキス、0.1%ペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%塩化マグネシウム、pH 6.8) で37℃、5日間培養し、得られた培養上清をSDS-PAGEにより分析した。

【0033】

SDS-PAGEはテフコ社のシステムを用いて実施した。すなわち、電気泳動槽 (No. 03-101) 、電源 (Model: 3540) 、ゲル12 % (01-005) 、SDS-PAGE用バッファークット (06-0301) を用いた。泳動条件は、18 mA/90分とした。泳動後のゲルの染色は、クマシーブリリアントブルーR250染色液 (0.1 %クマシーブリリアントブルーR 250、40%メタノール、10%酢酸) を用いて行い、その後脱色液 (10 %メタノール、7.5 %酢酸) で脱色して蛋白質を検出した。分子量マーカーには、アマシャムバイオサイエンス社のLMW Marker Kit (17-0446-01) を用いた。

【0034】

SDS-PAGE分析の結果、25kDa蛋白質が増強されている形質転換体が見出され、これら形質転換体では目的とするセルラーゼが生産されていることが確認された。これら形質転換体のうち、セルラーゼA162P、K166E及びAPKEを生産する形質転換体としてK215-40株、K215-42株及びK229-72株をそれぞれ選択し以降の解析に使用した。また、WO 01/90375に記載されたNCE5 (親セルラーゼ) を解析のコントロールとして使用した。

【0035】

実施例3：各形質転換体から得られたセルラーゼの評価

フミコーラ・インソレンス形質転換体K215-40株、K215-42株及びK229-72株を (N) 培地で、37℃、5日間培養して得られた培養上清を用いて、(1) pH 6.0、(2) pH 6.0且つリニアアルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) 200 ppm

添加、(3) pH 10.0の3試験区でEGU活性を測定した。

【0036】

EGU活性は以下のようにして測定した。基質溶液として、カルボキシメチルセルロース (Hercules社製) を終濃度3.5%となるように適切な緩衝液に溶解した。即ち、pH 6.0で測定する場合は0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) に、またpH 10.0で測定する場合は0.1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 10.0) に溶解した。基質溶液5 mLを試験管に取り、40℃の恒温槽にいれ10分間予熱した。これに試料溶液0.15 mLを加え、良く攪拌し、40℃で酵素反応を開始した。30分間反応させた後、40℃に設定しておいたR型粘度計 (東機産業RE 100) で粘度を測定した。各酵素反応条件下において、初期粘度を1/2に低下させる酵素量を1単位とした。試験区 (1) における酵素活性を100%として試験区 (2) 及び (3) の酵素活性を相対値で示すと以下の表のようになった。

【0037】

【表1】

試料	試験区		
	(1)	(2)	(3)
K215-30(A162P)	100	26.6	29.6
K215-42 (K166E)	100	26.7	29.5
K229-72 (APKE)	100	21.1	36.6
NCE5 (親セルラーゼ)	100	7.6	21.5

【0038】

以上の結果から、各セルラーゼ (A162P、K166E及び APKE) は、親セルラーゼと比較してLASに対して耐性で且つアルカリ性条件下で高い活性が保持されることが明らかとなった。

【0039】

【発明の効果】

本発明の新規なセルラーゼは、親セルラーゼと比較して界面活性剤に対して耐性であること及びアルカリ性条件下でより強い活性を示すことから、衣料用洗浄

剤に配合した場合に有用である。

【0 0 4 0】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<120> Detergent resistant Cellulase

<130> unknown

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Humicola insolens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..()

<223>

<400> 1

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro

1

5

10

15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp
20 25 30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys
35 40 45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala
50 55 60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly
65 70 75 80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys
145 150 155 160

Asp Ala Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg
195 200 205

<210> 2

<211> 615

<212> DNA

<213> Humicola insolens

<400> 2

cagtccggca gcggccgcac cacgcgctac tgggactgct gcaagccgtc gtgcgcgtgg 60

cccggaagg gcccggcgc cgtgcggacg tgcgaccggt gggacaacc gctgttcgac 120

ggcggcaaca cgcgcagcgg gtgcgacgcg ggcggcggcg cctacatgtg ctcggaccag 180

agcccggtggg cggtcagcga cgacctggcg tacggctggg cggccgtcaa cattgccggc 240

tccaacgaga ggcagtgggt ctgcgcctgc tacgagctga ccttcaccag cgggcccgtg 300

gcgggcaaga ggatgattgt gcaggcgagc aacacgggag gcgatttggg gaacaaccac 360

tttgatattg ctatgcccg cgggtggcgtc ggtatcttca acgcctgcac cgaccagtac 420

ggcgcgcccc ccaacggctg gggccagcgc tacggcggca tcagccaacg ccacgagtgc 480

gacgccttcc ccgagaagct caagcccggc tgctactggc gctttgactg gttcctcaac 540

gccgacaacc cgagcgtcaa ctggcggcag gtcagctgcc cggccgagat tgtggccaag 600

agcggctgct cgcgt 615

<210> 3

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A detergent resistant Cellulase

<400> 3

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro

1

5

10

15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp

20

25

30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys

35

40

45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala

50

55

60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly

65

70

75

80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr

85

90

95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr

100

105

110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys
145 150 155 160

Asp Pro Phe Pro Glu Lys Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg
195 200 205

<210> 4

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A detergent resistant Cellulase

<400> 4

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro
1 5 10 15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp
20 25 30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys
35 40 45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala
50 55 60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly
65 70 75 80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys
145 150 155 160

Asp Ala Phe Pro Glu Glu Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg
195 200 205

<210> 5

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A detergent resistant Cellulase

<400> 5

Gln Ser Gly Ser Gly Arg Thr Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro
1 5 10 15

Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Gly Pro Ala Pro Val Arg Thr Cys Asp
20 25 30

Arg Trp Asp Asn Pro Leu Phe Asp Gly Gly Asn Thr Arg Ser Gly Cys
35 40 45

Asp Ala Gly Gly Gly Ala Tyr Met Cys Ser Asp Gln Ser Pro Trp Ala
50 55 60

Val Ser Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Trp Ala Ala Val Asn Ile Ala Gly
65 70 75 80

Ser Asn Glu Arg Gln Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu Leu Thr Phe Thr
85 90 95

Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Arg Met Ile Val Gln Ala Ser Asn Thr
100 105 110

Gly Gly Asp Leu Gly Asn Asn His Phe Asp Ile Ala Met Pro Gly Gly
115 120 125

Gly Val Gly Ile Phe Asn Ala Cys Thr Asp Gln Tyr Gly Ala Pro Pro
130 135 140

Asn Gly Trp Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Gln Arg His Glu Cys
145 150 155 160

Asp Pro Phe Pro Glu Glu Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe Asp
165 170 175

Trp Phe Leu Asn Ala Asp Asn Pro Ser Val Asn Trp Arg Gln Val Ser
180 185 190

Cys Pro Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Gly Cys Ser Arg
195 200 205

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A primer for site-directed mutagenesis

<400> 6

ggggaagggg tcgcactcgt ggcgttg

27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A primer for site-directed mutagenesis

<400> 7

cttgagctcc tcggggaagg cgtcgca

27

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A primer for site-directed mutagenesis

<400> 8

gagctcctcg gggaaggggt cgcactcgtg

30

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

セルラーゼとして優れた性質を有し、界面活性剤に耐性であり、かつアルカリ性条件下でも高い活性を保持している新規なセルラーゼを提供すること。

【解決手段】

NCE5はセルラーゼとして優れた性質を有しており、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるセルラーゼである。このNCE5を親セルラーゼに、そのアミノ酸配列における一部のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換した新規なセルラーゼを取得し、それらセルラーゼの界面活性剤に対する耐性あるいはアルカリ性条件下での活性をチェックし、衣料用洗剤に配合した場合に有用であるセルラーゼを見出した。

【選択図】

なし。

特願2002-318303

出願人履歴情報

識別番号

[000006091]

1. 変更年月日

1990年 8月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋2丁目4番16号

氏 名

明治製菓株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.